

На правах рукописи

ИЛЬИНА ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА

**ХИМИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДНК В  
ИССЛЕДОВАНИИ БЕЛКОВ РЕПАРАЦИИ ДНК:  
ИДЕНТИФИКАЦИЯ Ku-АНТИГЕНА КАК  
БЕЛКА, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩЕГО С  
АПУРИНОВЫМИ/АПИРИМИДИНОВЫМИ  
САЙТАМИ**

03.01.04 – биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата химических наук



Новосибирск – 2011

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной  
медицины СО РАН

Научные руководители:

д.б.н., доцент **Ходырева Светлана Николаевна**

д.х.н., профессор, член-корр. РАН **Лаврик Ольга Ивановна**

Официальные оппоненты:

д.х.н., профессор **Кубарева Елена Александровна**

д.б.н., доцент **Бунева Валентина Николаевна**

Ведущая организация:

Институт цитологии и генетики СО РАН

Защита состоится « 25 » марта 2011 г. в 11 часов 30 минут  
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при  
Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
по адресу: 630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке  
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно знакомиться на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан « 24 » февраля 2011 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент



Коваль В. В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** ДНК каждой клетки подвергается действию разнообразных эндогенных и экзогенных факторов, вызывающих в ней различные повреждения. Повреждение ДНК может вызывать мутации, гибель клеток и их злокачественную трансформацию. Чтобы предотвращать такие последствия, клетки располагают несколькими специализированными системами репарации ДНК с частично перекрывающимися функциями. Эксцизионная репарация оснований (ЭРО) является одной из основных и наиболее важных систем репарации ДНК, поскольку ее действия направлены на исправление наиболее многочисленных повреждений, вызываемых эндогенными и экзогенными факторами, которые включают ионизирующее излучение, активные формы кислорода и некоторые противоопухолевые препараты [Schärer, 2003]. В целом, для процесса ЭРО нехарактерно существование стабильного белкового ансамбля неизменного состава, который бы полностью проводил устранения повреждения в ДНК. В ансамбле по мере протекания репарации один из ферментов (факторов) заменяется белком, необходимым для следующей стадии процесса. Такой принцип организации процесса вносит ограничения в исследование структурной организации репарационного ансамбля рентгеноструктурным анализом или другими физико-химическими методами. Аффинная модификация широко применяется для исследования специфических взаимодействий белков с лигандами – биополимерами или низкомолекулярными соединениями. В частности, ее использование позволяет получать ценную информацию о структурно-функциональной организации белково-нуклеиновых комплексов, что является важнейшей фундаментальной задачей молекулярной биологии и биохимии.

**Цель и задачи работы.** Целью данной работы являлось исследование взаимодействий белков экстрактов клеток человека с химически активными ДНК, имитирующими ДНК-интермедиаты различных этапов репарации ДНК. В ходе исследования планировалось решить следующие задачи:

- охарактеризовать вновь синтезированный фотоактивируемый аналог dСТР и в сравнении с ранее использованными аналогами выявить фотоактивируемые производные dСТР, которые наиболее пригодны для исследований в клеточных экстрактах;
- в экстрактах клеток человека провести поиск белков, специфически взаимодействующих с апуриновыми/апиримидиновыми (AP-) сайтами;
- отработать подходы к идентификации белков в составе ковалентных аддуктов с модифицированными ДНК-интермедиатами репарации ДНК;
- с использованием аффинной модификации, функциональных тестов и других методов изучить характеристики и биологическую значимость взаимодействия белков с AP-ДНК;

- оценить перспективность использования AP-ДНК для оценки содержания в клеточных экстрактах белков, узнающих AP-сайты.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** В настоящей работе химически активные ДНК-интермедиаты репарации ДНК были впервые применены для исследования репарации ДНК в экстрактах клеток человека. Для расширения возможностей аффинной модификации охарактеризован вновь синтезированный фотоактивируемый аналог dCТР и установлено, что с его использованием удастся в несколько раз повысить эффективность модификации клеточных белков синтезированными *in situ* фотоактивируемыми ДНК. В экстрактах клеток человека впервые с использованием ДНК, содержащей апуриновые/апиримидиновые (AP) сайты, проведен поиск белков, узнающих AP-сайты. Отработана универсальная методика идентификации белков в составе ковалентных конъюгатов, образованных белками экстрактов с химически активными ДНК, основанная на масс-спектрометрическом анализе, которая применима к различным ДНК-связывающим белкам, специфически узнающим определенные структурные особенности в ДНК. С ее использованием Ku80-субъединица Ku-антигена была идентифицирована как основной белок-мишень, который образует сшивки с AP-ДНК. Для оценки содержания в клеточных экстрактах активных в связывании ДНК форм Ku-антигена предложен удобный и эффективный подход, основанный на использовании AP-ДНК, и с его использованием проведен скрининг ряда культивируемых клеток меланом.

**Публикации и апробация работы.** Основные результаты работы отражены в 5 статьях и 1 патенте. Результаты работы были представлены на международных конференциях: «Chemical and biological problems of proteomics», Новосибирск, 2004; «International conference on chemical biology», Новосибирск, 2005; «Физико-химическая биология», Новосибирск, 2006; Russian–European Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability (Санкт-Петербург, 2008), III International Meeting «Early events in Human Pathologies», Barbizon, France, 2010 и др.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов, списка литературы. Она изложена на 132 стр. и включает 34 рисунка, 4 таблицы и список цитируемой литературы из 244 наименований.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

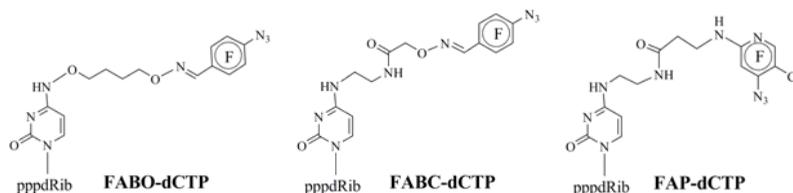
### 1. Исследование взаимодействия белков клеточных экстрактов с фотоактивируемыми интермедиатами репарации ДНК

В арсенале химически активных аффинных реагентов для исследования белок-нуклеиновых взаимодействий значительное место принадлежит аналогам ДНК на основе ароматических азидов [Khodyreva&Lavrik, 2005]. При активации УФ-светом арилазидных групп генерируются высоко

реакционноспособные частицы, которые могут атаковать ближайшие атомы с образованием ковалентной связи между контактирующими частями биополимеров. Последующий анализ образовавшихся продуктов "фотосшивки" белок-ДНК позволяет получать информацию о структурной организации белково-нуклеиновых комплексов.

### 1.1. Включение фотоактивируемых аналогов dNTP в ДНК ДНК-полимеразами клеточных экстрактов и фотоаффинная модификация белков экстрактов синтезированными *in situ* ДНК

Ранее были синтезированы и охарактеризованы аналоги dCTP, содержащие фотоактивируемые группы, присоединенные по экзоциклической аминогруппе цитозина [Wlassoff et al., 1995, Сафронов с соавт., 1997]. На рис. 1 представлены структурные формулы фотоактивируемых аналогов dCTP исследованных в данной работе – ранее использованных FАВО-dCTP и FАВС-dCTP и вновь синтезированного FАР-dCTP.



**Рис. 1. Структурные формулы исследованных в работе производных нуклеотидов**

**FАВО-dCTP** – экзо-N-[(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензилиденаминоокси)-бутилокси]-2'-дезоксирибозитидин-5'-трифосфат; **FАВС-dCTP** – экзо-N-[2-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензилиденаминооксиметилкарбамоил)-этил]-2'-дезоксирибозитидин-5'-трифосфат; **FАР-dCTP** – экзо-N-[2-[N-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил]-аминоэтил]-2'-дезоксирибозитидин-5'-трифосфат.

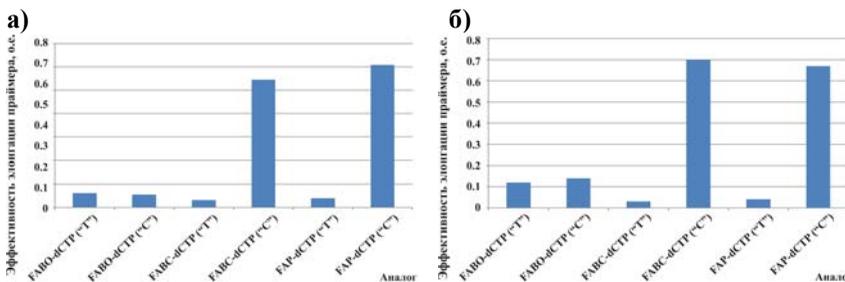
Значения кинетических параметров в реакции элонгации праймеров, катализируемой ДНК-полимеразой  $\beta$  (Pol  $\beta$ ), для FАР-dCTP и dCTP практически не отличаются. FАР-dCTP в составе ДНК обеспечивает высокий уровень сшивки с ДНК-полимеразой  $\beta$  (при 4-х кратном избытке Pol  $\beta$  по отношению к ДНК не менее 50% фотоактивируемой ДНК присоединяется к ферменту в условиях полного фотоллиза). Уровни пришивки FАВО-dCTP- и FАВС-dCTP-содержащих ДНК к Pol  $\beta$  при аналогичных условиях (при 85%-ном фотоллизе фотоактивируемой группы) составляли около 20% и 2.5% соответственно [Драчкова с соавт., 2001].

Несмотря на достаточно широкое применение в исследованиях фотоактивируемых ДНК, синтезированных непосредственно в экстрактах, эффективность включения аналогов dNTP в ДНК ДНК-полимеразами клеточных экстрактов и влияние этого параметра на модификацию белков экстрактов фотоактивируемыми ДНК количественно не была оценена. Следует отметить, что эффективность включения фотоактивируемых dNTP в состав ДНК в экстрактах может модулироваться присутствием белковых факторов, вклад которых не всегда можно учесть при экспериментах в

системе, реконструированной из очищенных белков. В связи с этим при характеристике аналогов dNTP, наиболее адекватным является сравнение эффективности синтеза фотоактивируемых ДНК в клеточных экстрактах, где присутствуют те же белки и в том же соотношении, что и в клетке. Это является принципиальным отличием экстрактов от реконструированных систем, где состав и соотношения белков задаются исследователем.

Синтезированные *in situ* фотоактивируемые ДНК ранее применялись в исследовании белков репарации ДНК в экстрактах клеток млекопитающих, в том числе в ядерном экстракте семенников крупного рогатого скота (ЯЭСКС) [Lavrik et al., 2001, Lebedeva et al., 2002, Lebedeva с соавт., 2003], но не охватывали клеток человека. Однако наибольший интерес представляет исследование системы репарации ДНК в клетках человека, поэтому в представленной работе использованы цельноклеточный экстракт HeLa и ЯЭСКС как образец сравнения.

Поскольку ранее было показано, что аналоги dCTP могут опознаваться Pol  $\beta$  как dTTP, но с разной эффективностью [Драчкова с соавт., 2001], для синтеза фотоактивируемых ДНК ферментами экстрактов использовали две матрично-праймерные системы, в которых в матрицах в положениях +1 находились dGMP или dAMP, что обеспечивает возможность встраивания этих аналогов как dCMP или dTMP.



**Рис. 2. Количественная оценка эффективности элонгации праймера в составе ДНК-дуплекса с выступающей матричной цепью ДНК-полимеразами ЯЭСКС (а) и экстракта клеток HeLa (б) с использованием различных фотоактивируемых аналогов dNTP в качестве субстрата**

Реакционные смеси содержали один из аналогов (30 мкМ), [ $^{32}$ P]-ДНК (0.1 мкМ) и белки ЯЭСКС (3 мг/мл) (а) или экстракта клеток HeLa (1.4 мг/мл) (б), а также стандартные компоненты: 50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ NaCl, 0.25 мМ ДТТ и 5% глицерин. Реакцию синтеза проводили в течение 15 мин при 37°C. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины. Обозначения аналогов приведены под рисунком. Символы ("С") и ("Т") обозначают в качестве какого из dNTP (dCTP или dTTP) был использован аналог в данной реакционной смеси. Эффективность элонгации праймера – доля праймера, удлиненного фотоактивируемым dNMP. На гистограмме представлены данные трех независимых определений. Ошибка не превышала 15%.

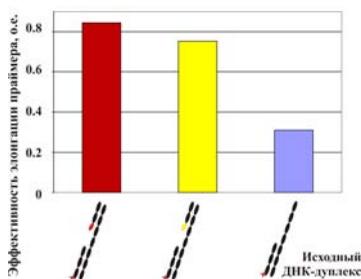
Результаты количественной оценки эффективности синтеза фотоактивируемых ДНК для обоих экстрактов суммированы на рис. 2. Исходя из полученных данных, можно заключить, что ряды аналогов, выстроенные

по эффективности их включения в ДНК, практически совпадают для обоих экстрактов.

При сравнении эффективности элонгации праймера в составе различных структур ДНК фотоактивируемым dNMP, эндогенными ДНК-полимеразами экстракта (рис. 3), обнаружено, что наибольший выход продуктов характерен для ДНК, содержащей мононуклеотидную брешь, фланкированную на 5'-краю фосфатной группой.

Известно, что Pol  $\beta$  наиболее эффективно включает dNMP в мононуклеотидных брешах с фосфатом на 5'-краю [Chagovetz *et al.*, 1997].

Кроме того, было показано, что в ЯЭСКРС синтез фотоактивируемых ДНК в основном осуществляет Pol  $\beta$  [Лебедева с соавт., 2003].



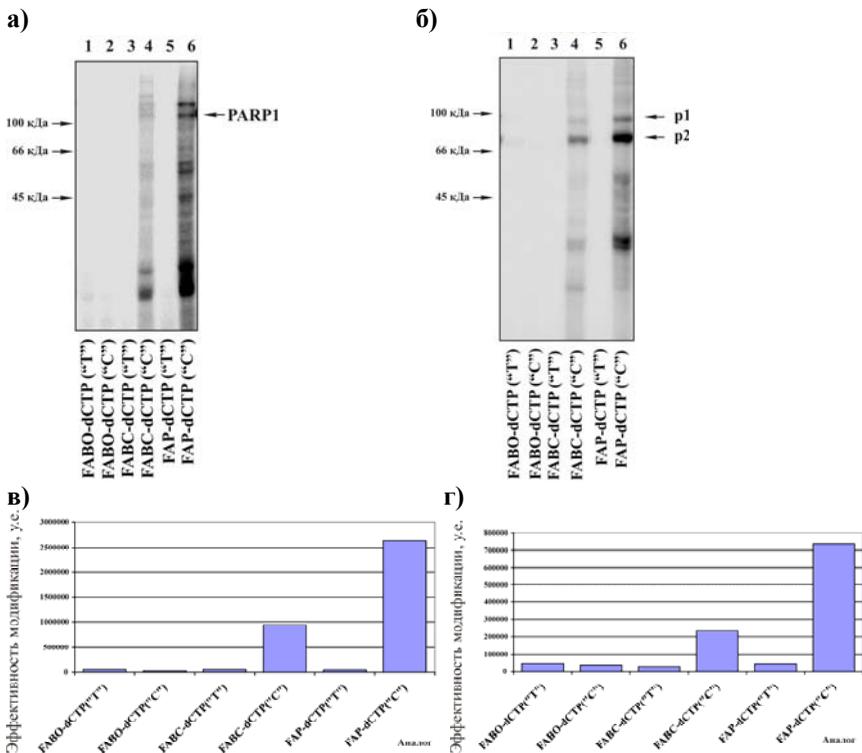
**Рис. 3. Количественная оценка эффективности элонгации праймера в составе различных ДНК-дуплексов эндогенными ДНК-полимеразами экстракта клеток HeLa с использованием FAP-dCTP в качестве субстрата**

Состав реакционных смесей см. в подписи к рис. 2. Схематическое обозначение использованных ДНК-дуплексов приведено на рисунке. ■ ■ – нуклеотид с гидроксильной (фосфатной) группой на 5'-конце. На гистограмме представлены данные трех независимых определений. Ошибка не превышала 15%.

С учетом специфичности Pol  $\beta$  в синтезе ДНК на матрично-затравочных комплексах, отличающихся по структуре, можно предположить, что и в экстракте клеток HeLa Pol  $\beta$  вносит основной вклад во включение фотоактивируемых dNMP.

Для дальнейшей характеристики FAP-dCTP и определения аналогов dCTP, наиболее пригодных для исследований в экстрактах, для нескольких производных dCTP был проведен сравнительный анализ модификации белков экстракта клеток HeLa и ЯЭСКРС ДНК, синтезированными *in situ*. При сопоставимых уровнях включения аналогов dNMP ДНК ферментами экстракта (рис. 2) суммарный выход продуктов модификации белков определяется типом фотоактивируемого dNMP (рис. 4). Для обоих экстрактов наибольший выход продуктов модификации белков наблюдается для фотоактивируемой ДНК, при синтезе которой FAP-dCTP использовался в качестве аналога dCTP (рис. 2). Для FABC-dCTP, использованного в качестве аналога dCTP при сопоставимом с FAP-dCTP уровне включения в ДНК (рис. 2), выход продуктов модификации белков оказался в 2.5–3 раза ниже (рис. 4).

Таким образом, наиболее перспективным для исследований в клеточных экстрактах, как и в реконструированной системе, является вновь синтезированный аналог FAP-dCTP, обеспечивающий максимальные выходы продуктов модификации белков из всех исследованных до сих пор аналогов dCTP.



**Рис. 4.** Модификация белков ЯЭСКРС (а, в) и экстракта клеток HeLa (б, г) фотоактивируемыми ДНК-дуплексами с выступающей матричной цепью, полученными *in situ*

а), б) Состав реакционных смесей см. в подписи к рис. 2. После окончания реакции синтеза реакционные смеси облучали 15 мин при 0°C УФ-светом лампы ДРШ-120 с использованием светофильтра УФС-6 (длина волны падающего света – 313–365 нм). Продукты реакции разделяли электрофорезом в 10% ПААГ по Леммли. Обозначения аналогов приведены под рисунком. Символы ("С") и ("Т") обозначают в качестве какого из dNTP (dCTP или dTTP) был использован аналог в данной реакционной смеси.

Эффективность модификации белков экстрактов ЯЭСКРС (в) и HeLa (г) фотоактивируемыми ДНК, полученными *in situ*. Эффективность модификации белков – суммарная радиоактивность в дорожке, соответствующая продуктам модификации белков. На гистограмме представлены данные трех независимых определений. Ошибка не превышала 20%.

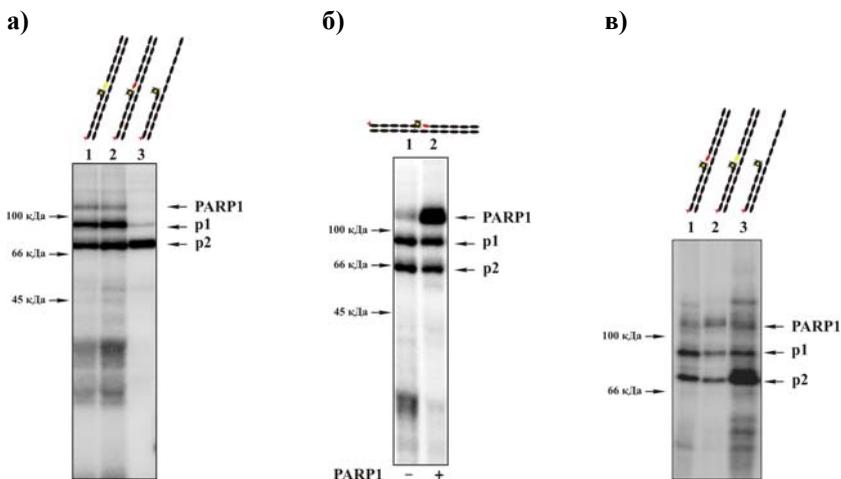
## 1.2. Фотоаффинная модификация в исследовании системы эксцизионной репарации оснований в экстрактах клеток человека

В предшествующих работах лаборатории для исследования белковых компонентов ЭРО были использованы экстракты эмбриональных фибробластов мыши и ЯЭСКРС [Lavrik et al., 2001, Лебедева с соавт., 2003]. В рамках данной работы фотоаффинная модификация впервые использована для изучения белков системы ЭРО в экстрактах клеток человека.

Фотоактивируемые ДНК-интермедиаты ЭРО были получены с использованием FAP-dCTP *in situ* или предварительно синтезированы с помощью Pol β. Фотоактивируемая ДНК с выступающей матричной цепью не является ДНК-интермедиатом ЭРО и использована в качестве ДНК-структуры, которая применялась ранее при характеристике аналогов dNTP.

Спектр модифицируемых белков экстракта клеток HeLa определяется типом ДНК-дуплекса (рис. 5 а) и обусловлен специфичностью узнавания структуры ДНК белками. Для ДНК-дуплексов с одноцепочечным разрывом, в которых олигонуклеотид, фланкирующий разрыв, содержит на 5'-конце фосфатную или гидроксильную группы, спектры модифицируемых белков, различаются незначительно. Для этих ДНК-дуплексов характерно образование двух основных продуктов модификации p1 и p2 с кажущимися молекулярными массами около 90 кДа и 80 кДа соответственно. Для ДНК-дуплекса с выступающей матричной цепью характерно преимущественное образование продукта p2. Интересно отметить, что ни в ЯЭСКРС, ни в экстракте эмбриональных фибробластов мыши продукты модификации белков с такой кажущейся молекулярной массой не были зарегистрированы [Лебедева с соавт., 2003, Lavrik et al., 2001]. Это позволяет предположить, что модифицируемые белки либо специфичны для клеток человека, либо представлены в них большим числом копий, что обуславливает высокий выход продуктов сшивки с фотоактивируемыми ДНК. Более высокомолекулярный продукт с кажущейся молекулярной массой около 120 кДа, по-видимому, относится к поли(ADP-рибозо)полимеразе 1 (PARP1) (рис. 5б). Интенсивность этого продукта увеличивается при добавлении экзогенной PARP1. Присутствие экзогенной PARP1 уменьшает количество продуктов модификации с низкими молекулярными массами и не влияет на выход продуктов p1 и p2, что указывает на эффективное связывание соответствующих белков с ДНК.

Суммарный выход продуктов модификации белков выше для ДНК-дуплексов с одноцепочечными разрывами, чем с выступающей матричной цепью. Это может быть обусловлено как различием в уровнях превращения исходных ДНК в фотоактивируемые (рис. 3), так и различием в эффективности взаимодействия белков с ДНК для разных ДНК-дуплексов. Чтобы различить эти возможности, проведена модификация белков предсинтезированными фотореакционноспособными ДНК (рис. 5в), в которых независимо от структуры ДНК иницирующий праймер полностью элонгирован фотоактивируемым FAP-dCMP. Наибольший выход продуктов модификации белков наблюдается для ДНК с выступающей матричной цепью. Следовательно, более низкие выходы продуктов фотоаффинной модификации белков экстракта для такой ДНК, синтезированной *in situ*, обусловлены менее эффективным превращением исходной ДНК в фотоактивируемую по сравнению с ДНК, содержащими бреши (см. рис. 3).



**Рис. 5. Модификация белков экстракта клеток HeLa предсинтезированными (в) и синтезированными *in situ* (а, б) фотоактивируемыми ДНК-дуплексами**

Условия модификации белков и анализа продуктов реакции см. в подписи к рис. 4. Панель б, дорожка 2 – реакционная смесь дополнительно содержала поли-(ADP-рибозо)полимеразу 1 (PARP1) (60 нМ).

Схематические обозначения использованных ДНК-дуплексов приведены на рисунке.  – остаток FAP-dCMP.

Поскольку при фотоаффинной модификации белков ДНК, имитирующими интермедиаты эксцизионной репарации оснований, в экстракте клеток человека были обнаружены специфические продукты сшивок, которые не регистрировались в экстрактах клеток *Mus musculus* и *Bos taurus*, представляло интерес идентифицировать эти белки. Для этой цели было исследовано взаимодействие белков с ДНК, содержащей апуриновые/апиримидиновые сайты (АР-сайты). АР-сайты, репарируются системой ЭРО и представляют собой более ранние интермедиаты этого процесса по сравнению с разрывами [Schärer, 2003].

## 2. Исследование взаимодействия белков клеточных экстрактов с ДНК, содержащими АР-сайты

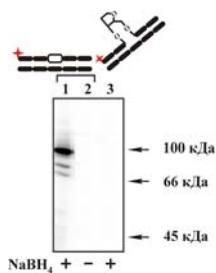
АР-сайты являются наиболее часто встречающимися повреждениями в ДНК [Lindahl, 1993]. Они появляются в результате спонтанного или катализируемого ДНК-гликозилазами гидролиза N-гликозидной связи между азотистым основанием и дезоксирибозой в ДНК [Lindahl, 1972]. Нерепарированные АР-сайты цитотоксичны и мутагенны [Loeb, 1985]. Это обуславливает интерес к идентификации белков, взаимодействующих с АР-сайтами, и, возможно, участвующих в регуляции их репарации.

Остатки дезоксирибозы в АР-сайтах находятся в равновесии между циклической фуранозной и ациклической альдегидной формами. Альдегидная

форма может реагировать с первичными аминогруппами белков, образуя основания Шиффа. Образование основания Шиффа – обратимый процесс, однако связь белка с ДНК можно стабилизировать за счет восстановления боргидридом натрия [Левина с соавт., 1980], что позволяет использовать AP-ДНК в качестве химически активной ДНК.

### 2.1. Поиск и идентификация белков клеток человека, взаимодействующих с AP-сайтами с формированием основания Шиффа

Для поиска белков человека, способных к формированию ковалентных аддуктов с AP-сайтами, был использован ДНК-дуплекс (32 н.п.), содержащий AP-сайт в середине радиоактивно меченой цепи. В цельноклеточных экстрактах нескольких культивируемых линий клеток человека основные продукты сшивки белков с AP-ДНК имеют одинаковую электрофоретическую подвижность. Кажущаяся молекулярная масса этих продуктов, оцененная по электрофоретической подвижности, соответствует приблизительно 95 кДа (рис. 6, дор. 1). Следует отметить, что кажущаяся молекулярная масса продуктов сшивки белка и ДНК приблизительно соответствует сумме их масс.



**Рис. 6. Поиск белков экстракта клеток HeLa, взаимодействующих с AP-ДНК**

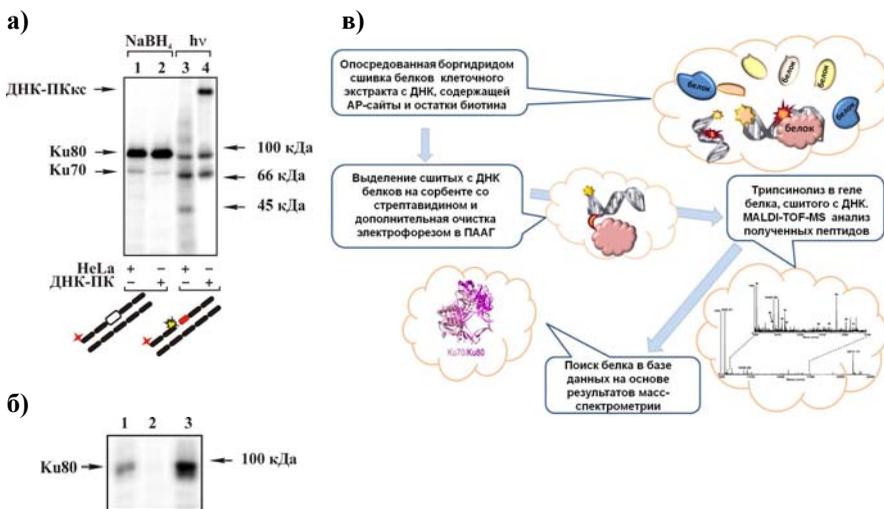
Реакционные смеси содержали 0.1 мкМ 5'-[<sup>32</sup>P] ДНК, белки экстракта HeLa (1.4 мг/мл) и стандартные компоненты: 50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 50 мМ NaCl, 10 мМ ЭДТА, 5% глицерин, 0.025% NP-40, 0.25 мМ ДТТ и ингибиторы протеаз. Время инкубации 10 мин при 37 °С. По окончании реакции добавляли 20 мМ NaBH<sub>4</sub> (где указано) и инкубировали 30 мин при 0°С. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 10% ПААГ по Леммли: дор. 1 – инкубация белков с AP-ДНК; дор. 2 – то же, но без обработки NaBH<sub>4</sub>; дор. 3 – инкубация белков с ДНК, содержащей аналог AP-сайта – остаток (ТНФ). Схематическое обозначение использованных ДНК-дуплексов приведено на рисунке. □ – AP-сайт.

При замене в структуре ДНК AP-сайта на его аналог – остаток 3-гидрокси-2-гидроксиметилтетрагидрофурана (ТНФ) – (рис. 6, дор. 3) или без обработки NaBH<sub>4</sub> (рис. 6, дор. 2) продукты сшивки ДНК-белок не регистрируются.

Ни один из белков, для которых было достоверно установлено взаимодействие с AP-сайтами с образованием основания Шиффа, не обладает подходящей молекулярной массой, чтобы формировать указанные продукты. Для идентификации белка использовали несколько подходов. Аффинная модификация белков экстракта клеток HeLa фотоактивируемыми ДНК, имитирующими ДНК-интермедиаты более поздних стадий ЭРО, выявила продукты сшивки с белками с кажущимися молекулярными массами около 92 и 80 кДа (рис. 5). С учетом набора, кажущихся молекулярных масс продуктов сшивки белков с AP-ДНК и фотоактивируемыми ДНК, а также длины присоединяемого к белку олигонуклеотида (16 и 32 н.о. для

фотоактивируемой ДНК и AP-ДНК соответственно), было предположено, что возможным кандидатом является Ку-антиген (Ку).

Ку-антиген – эукариотический гетеродимерный ДНК-связывающий комплекс, состоящий из субъединиц с молекулярными массами около 70 кДа (Ку70) и 83 кДа (Ку80). Его основная функция связана с репарацией двухцепочечных разрывов ДНК путем негомологичного соединения концов. Ку-антиген, входящий в состав ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) наряду с каталитической субъединицей (ДНК-ПКкс), примерно в 100 раз увеличивает сродство ДНК-ПКкс к концам ДНК [Downs&Jackson, 2004].



**Рис. 7. Идентификация белка экстракта клеток HeLa, образующего сшивки с AP-ДНК**

а) Сравнение продуктов сшивки полипептидов в экстракте клеток HeLa и препарате ДНК-ПК с AP- (дор. 1 и 2) и фотоактивируемой ДНК (дор. 3 и 4). Реакционные смеси содержали 0.1 мкМ 5'-[<sup>32</sup>P] ДНК, белки экстракта (1.4 мг/мл) (дор. 1 и 3) или ДНК-ПК (0.1 мкМ) (дор. 2 и 4) и стандартные компоненты (см. рис. 6). Условия проведения реакции см. в подписи к рис. 4 для фотоактивируемой ДНК или к рис. 6 для AP-ДНК. Под радиоавтографом приведено схематическое обозначение использованных ДНК-дуплексов; б) Идентификация белка методом иммунопреципитации с использованием антител против Ku80. Состав реакционных смесей и условия проведения реакции см. в подписи к рис. 6. Дор. 1 – аликвота реакционной смеси, дор. 2 и 3 – анализ продуктов, адсорбированных на протеин G-сефарозе в присутствии преиmunной сыворотки или анти-Ku80 антител соответственно; в) Схема идентификации белков в составе ковалентных аддуктов с AP-ДНК с использованием масс-спектрометрии.

При сравнительном анализе сшивок белок-ДНК (фотоактивируемой и AP-), образовавшихся при использовании экстракта клеток HeLa и ДНК-ПК (в состав которой входит Ку-антиген), выделенной из тех же клеток, выявлены продукты с совпадающей электрофоретической подвижностью (рис. 7а).

Следует отметить, что AP-ДНК проявляет большую селективность, чем фотоактивируемая ДНК, образуя сшивки с меньшим числом белков.

Дополнительно белок идентифицирован методом иммунопреципитации, как описано в [Lavrik et al., 2001], с использованием анти-Ku80 антител (рис. 7б).

И, наконец, природа белка в составе ковалентного аддукта с AP-ДНК установлена методом пептидного картирования на основе данных матричной лазерной десорбционной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS) (см. схему на рис. 7в). Белок идентифицирован как Ku80-полипептид (Mowse score 115, coverage 15%).

Таким образом, тремя независимыми подходами было показано, что основной продукт ковалентного присоединения AP-ДНК к белкам экстракта клеток человека относится к Ku80-субъединице Ku-антигена.

## **2.2. Функциональные аспекты взаимодействия Ku с AP-ДНК**

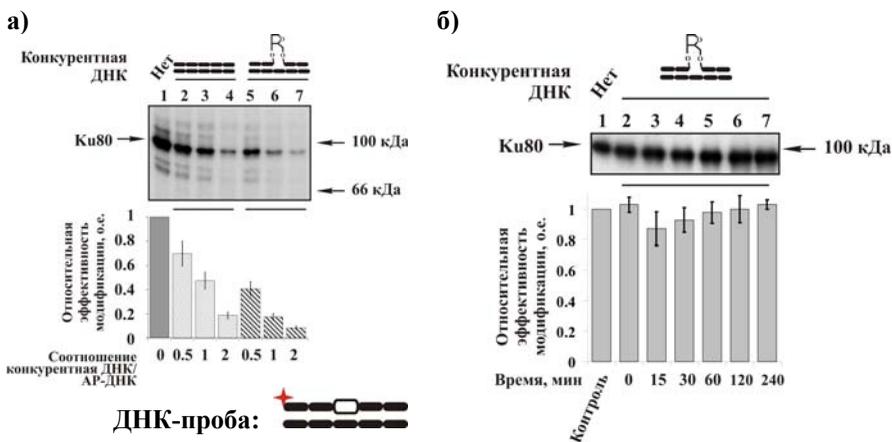
Ku наиболее эффективно связывается с двухцепочечными концами ДНК; кроме того, он способен взаимодействовать с одноцепочечными разрывами, брешами, «пузырями» [Downs&Jackson, 2004]. Однако взаимодействие Ku с AP-сайтами в литературе ранее не описано. AP-сайты репарируются системой ЭРО [Schärer, 2003], поэтому взаимодействие Ku, который не относится к белкам этой системе, с ДНК-интермедиатами ЭРО неожиданно. В связи с этим возникают вопросы о специфичности и биологической значимости взаимодействия Ku80 с AP-ДНК.

Некоторые характеристики взаимодействия Ku-антигена с AP-ДНК были исследованы с использованием клеточных экстрактов и ДНК-ПК. Данные по влиянию конкурентных ДНК на эффективность модификации Ku-антигена экстракта AP-ДНК (рис. 8а) свидетельствуют о специфичности взаимодействия Ku с AP-сайтами, поскольку ДНК, содержащая аналог AP-сайта (остаток ТНФ), снижает пришивку AP-ДНК к Ku80 в значительно большей степени, чем обычный ДНК-дуплекс.

Следует отметить, что аффинная модификация в присутствии конкурентных ДНК позволяет продемонстрировать специфичность взаимодействия исследуемого белка с определенным типом ДНК, даже если белок не выделен в индивидуальном состоянии. Более того, избирательность взаимодействия Ku с AP-сайт-содержащей ДНК удалось зарегистрировать даже, несмотря на высокое сродство этого белка к двухцепочечным концам.

Формирование белком основания Шиффа с дезоксирибозой AP-сайта часто вовлечено в процесс каталитического расщепления AP-сайтов [Schärer, 2003]. Для выяснения возможных каталитических функций Ku-антигена представляло интерес определить способность белка к расщеплению AP-сайтов. При использовании ДНК-ПК как источника Ku-антигена и ДНК-дуплекса, содержащего AP-сайт в середине цепи, расщепления AP-сайта не обнаружено (данные не проиллюстрированы). Однако другой группой

исследователей было установлено, что Ku-антиген проявляет AP- и dRP-лиазные активности в отношении AP-сайтов и 5'-dRP-остатков, расположенных в непосредственной близости от двухцепочечного разрыва ДНК [Roberts et al., 2010]. По-видимому, для адекватного проявления лиазной активности необходима точная ориентация AP-сайта и 5'-dRP остатка относительно определенных лизинов. Для Ku-антигена характерно ориентированное связывание с ДНК [Yoo et al., 1999]. При связывании Ku-антигена с двухцепочечными концами ДНК Ku70-субъединица расположена ближе к концу ДНК, а Ku80 смещена вглубь ДНК. Для использованной в настоящей работе AP-ДНК, по-видимому, не достигалась продуктивная ориентация субстрата.



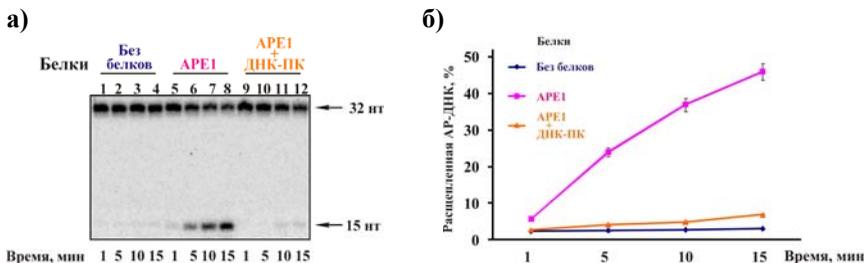
**Рис. 8. Характеристики взаимодействия Ku-антигена с AP-ДНК: специфичность (а) и стабильность комплексов (б)**

Белки экстракта (1.4 мг/мл) инкубировали с 5'-<sup>32</sup>P] AP-ДНК (0.1 мкМ) **а**) в присутствии (дор. 2–7) или отсутствии (дор. 1) конкурентных ДНК **б**) после предварительной инкубации добавляли конкурентную ДНК, содержащую остаток TNF (0.5 мкМ) (дор. 2–7) и продолжали инкубацию при 37°C; через определенные промежутки времени отбирали аликвоты. Остальное аналогично подписи к рис. 6. Относительная эффективность рассчитывалась как отношение уровней модификации белка в пробе, содержащей конкурентную ДНК, и контрольном образце без конкурентных ДНК.

Типы использованных ДНК-пробы и конкурентных ДНК схематично изображены на рисунке.

Образование оснований Шиффа с AP-сайтами потенциально может быть вовлечено в их временную защиту или регуляцию репарации. Такой механизм был предложен для монофункциональной ДНК-гликозилазы MutY, формирующей с AP-сайтами значительно более стабильные комплексы, чем бифункциональные ДНК-гликозилазы [Zharkov&Grollman, 1998]. С учетом возможности существования такого механизма, оценено время жизни комплексов Ku•AP-ДНК и за 4 часа не обнаружено их значимого распада (рис. 8б). Возможно, Ku, участвует во временной защите AP-сайтов.

Поскольку АР-эндонуклеаза 1 (APE1) – это основной фермент ЭРО высших эукариот, гидролизующий АР-сайты [Wilson&Barsky, 2001], было оценено влияние Ку-антигена (составе ДНК-ПК) на активность АРЕ1 (рис. 9). ДНК-ПК при эквимольярной концентрации по отношению к ДНК значительно ингибирует гидролиз АР-сайтов, что указывает на возможную функциональную значимость взаимодействия Ку-антигена с АР-сайтами.



**Рис. 9. Влияние ДНК-ПК на активность АРЕ1**

а) Реакционные смеси содержали  $5'$ - $^{32}$ P] АР-ДНК (0.1 мкМ), АРЕ1 (1 нМ), ДНК-ПК (0.1 мкМ), 50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ, 0.1 мг/мл BSA. Смесь инкубировали при 37°C, через указанные интервалы времени отбирали аликвоты, к которым добавляли 20 мМ ЭДТА, 20 мМ NaBH<sub>4</sub> и инкубировали 30 мин при 0°C. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины; б) Степень гидролиза АР-сайтов АР-эндонуклеазой 1.

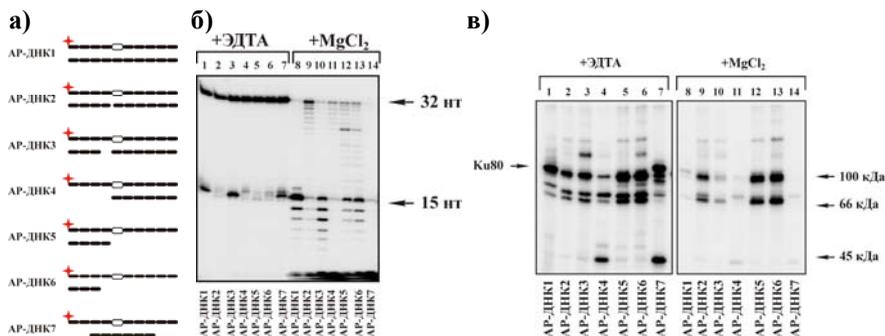
Принимая во внимание способность Ку взаимодействовать с АР-сайтами через формирование оснований Шиффа, было предположено, что Ку может принимать участие в регуляции репарации АР-сайтов в составе кластерных повреждений, для которых такая регуляция особенно важна. Кластерные повреждения включают близко расположенные окисленные основания, АР-сайты, одноцепочечные разрывы или их сочетания, расположенные в одной или обеих цепях ДНК. При неправильной регуляции репарации кластерных повреждений могут возникать более токсичные для клеток двухцепочечные разрывы [Gulston *et al.*, 2004]. При образовании двухцепочечных разрывов под действием ДНК-повреждающих агентов на концах ДНК могут содержаться выступающие одноцепочечные участки, влияющие на сродство Ку-антигена к ДНК.

На рис. 10 для набора АР-ДНК с различной структурой представлены результаты анализа их сшивки с белками экстракта клеток HeLa и данные определения целостности АР-сайт-содержащих олигонуклеотидов при инкубации в присутствии и в отсутствие ионов магния.

Характер и уровни расщепления олигонуклеотидов зависят от присутствия Mg<sup>2+</sup> и структуры ДНК-пробы. В присутствии ионов Mg<sup>2+</sup> (рис. 10б, дор. 8–14) эффективность расщепления АР-сайтов выше, чем без них (рис. 10б, дор. 1–7). Это связано со специфичностью и эффективностью действия ферментов экстрактов, принимающих участие в процессинге ДНК.

Гидролиз AP-сайтов AP-эндонуклеазами экстракта, происходящий в присутствии ионов  $Mg^{2+}$ , приводит к «инактивации» AP-ДНК-зондов, что, в свою очередь, снижает эффективность модификации белков экстракта. Кроме того, необходимо учитывать и влияние структуры AP-ДНК на скорость гидролиза AP-сайтов. Так, например, AP-ДНК1 практически полностью гидролизуется уже за 30 с, тогда как реакция образования основания Шиффа между Ku80 и AP-ДНК1 выходит на плато примерно за 10 мин (определено в отсутствие  $Mg^{2+}$ ). AP-сайты в ДНК с дополнительными повреждениями гидролизуются с меньшей скоростью и, «инактивация» этих ДНК-проб в меньшей степени влияет на картину модификации белков экстрактов. Известно, что для взаимодействия Ku с ДНК ионы магния не требуются [Chiu *et al.*, 2001]. Учитывая перечисленные факты, можно предположить, что уровень пришивки конкретной ДНК к Ku в отсутствие ионов магния более адекватно характеризует родство Ku к этой ДНК.

Эффективность модификации и спектры модифицируемых AP-ДНК клеточных белков при отсутствии ионов магния зависят от структуры использованной ДНК-пробы (рис. 10в, дор. 1-7). Выход продуктов модификации конкретного белка в клеточных экстрактах зависит от нескольких параметров: концентрации комплекса исследуемого белка с ДНК, которая определяется концентрацией белка в экстракте, сродством белка к ДНК-пробе и конкуренцией других белков за ДНК. Если рассматривать уже сформированные нековалентные комплексы белок•реакционноспособная ДНК, то значительную роль в определении выхода продуктов модификации может играть взаимная ориентация реагирующих групп белка и ДНК, которая может различаться в комплексах белка с различными AP-ДНК.



**Рис. 10. Взаимодействие белков экстракта HeLa с AP-ДНК, содержащими дополнительные повреждения**

**а)** Схематическое изображение использованных AP-ДНК; **б, в)** Состав реакционных смесей и условия проведения реакции см. в подписи к рис. 6. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины (**б**) и в 10% ПААГ по Леммли (**в**).

Тип использованной AP-ДНК указан на рисунке.

Все AP-ДНК, кроме AP-ДНК7, имеют, по крайней мере, один "тупой" двухцепочечный конец, который необходим Ku для эффективного связывания с ДНК. Среди AP-ДНК, имеющих "тупой" двухцепочечный конец, наименьший выход продуктов модификации Ku80 характерен для AP-ДНК4. Это может быть обусловлено конкуренцией Ku и других белков за ДНК. Действительно, эта ДНК образует более низкомолекулярные продукты модификации (рис. 10в, дор. 4). Кроме того, другие белки, которые взаимодействуют с 5'-выступающей частью, но не способны формировать основания Шиффа, могут влиять на выход продуктов модификации Ku. Для AP-ДНК7, у которой с каждой стороны имеется одноцепочечный участок по 8 нт., продукт, относящийся к Ku80, является минорным. Кроме того, появляются два новых продукта – более высокомолекулярный и низкомолекулярный. Низкомолекулярный продукт имеет такую же электрофоретическую подвижность, что и низкомолекулярный продукт для AP-ДНК4 (рис. 10в, дор. 7 и 4 соответственно).

Исходя из анализа данных литературных источников, нельзя однозначно решить вопрос о влиянии длины свисающих одноцепочечных участков в AP-ДНК7 на образование комплексов с Ku-антигеном. С одной стороны известно, что 3'- и 5'-выступающие одноцепочечные участки на концах ДНК-дуплексов длиной в несколько нуклеотидов не влияют на сродство Ku-антигена к ДНК [Downs&Jackson, 2004]. С другой стороны, показано, что Ku связывает менее эффективно ДНК-дуплексы с длинными 5'-выступающими одноцепочечными участками, чем с "тупыми" концами [Falzon et al., 1993].

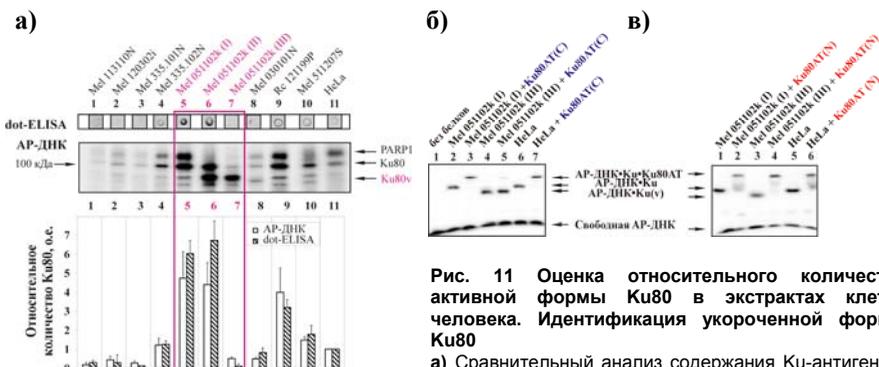
Из-за отсутствия Ku-антигена в индивидуальном состоянии невозможно напрямую оценить сродство этого белка к различным AP-ДНК. Для выяснения факторов, обуславливающих различия в эффективности модификации Ku80 AP-ДНК, несущими дополнительные повреждения, проведена фотоаффинная модификация белков экстракта клеток HeLa с использованием набора ДНК, в которых вместо AP-сайта находился GAP-dCMP (данные не проиллюстрированы). В отличие от AP-ДНК, присоединяющихся только к Ku80-субъединице, фотоактивируемые ДНК модифицируют обе субъединицы Ku-антигена. Для ДНК, не содержащей дополнительных повреждений, характерен более высокий уровень сшивки с Ku70, чем с Ku80. Введение любого повреждения в ДНК приводит к перераспределению сшивок в пользу Ku80. Изменение структуры фотоактивируемых ДНК незначительно влияет на суммарный уровень модификации обеих субъединиц Ku-антигена; максимальная разница не превышает 20%. Это указывает на сопоставимую эффективность образования комплексов Ku-антигена со всеми ДНК. Однако если уровни пришивки к Ku-антигену фотоактивируемой ДНК, у которой с каждой стороны имеется одноцепочечный участок по 8 нт., и других фотоактивируемых ДНК

сопоставимы, то для AP-ДНК7 с аналогичной структурой концов выход продуктов шивки значительно ниже, чем для других AP-ДНК (рис. 10в).

Таким образом, исходя из совокупности данных аффинной модификации Ku-антигена фотоактивируемыми и AP-сайт-содержащими ДНК различной структуры, можно предположить, что изменения взаимной ориентации реагирующих групп белка и ДНК при переходе от одной AP-ДНК к другой, в значительной степени определяют эффективность формирования оснований Шиффа.

### 2.3. Использование AP-ДНК для определения содержания Ku80 в экстрактах клеток

Поскольку пришивка AP-ДНК к Ku80 (см. рис. 6) в экстрактах происходит с высокой селективностью и эффективностью, этот подход потенциально может быть использован для оценки содержания активных в связывании ДНК форм Ku-антигена в экстрактах клеток в присутствии других клеточных белков. Сравнительный анализ содержания Ku80 в экстрактах клеток нескольких культивируемых линий меланом и HeLa, проведенный с использованием dot-ELISA и AP-ДНК, показал, что количество ковалентных аддуктов Ku80 с AP-ДНК варьирует в значительных пределах и, в целом, положительно коррелирует с содержанием этого белка, оцененным иммуноферментным окрашиванием (рис. 11а).



**Рис. 11** Оценка относительного количества активной формы Ku80 в экстрактах клеток человека. Идентификация укороченной формы Ku80

**а)** Сравнительный анализ содержания Ku-антигена в экстрактах клеток меланом. **AP-ДНК:** Реакционные

смеси содержали 20 нМ 5'-[<sup>32</sup>P] AP-ДНК, белки экстрактов (0.1 мг/мл). Остальные условия см. в подписи к рис. 6. Для dot-ELISA анализа были использованы моноклональные анти-Ku80 антитела против С-концевого участка и 0.4 мкг белков клеточного экстракта. **Количество Ku80** в dot-ELISA анализе оценивали по интенсивности иммунохимического окрашивания, а при анализе с использованием AP-ДНК рассчитывали как долю AP-ДНК, сшитой с Ku80. Для экстрактов клеток меланом определяли **относительное количество Ku80**, нормируя значения на соответствующую величину для экстракта клеток HeLa; **б)** Идентификация укороченной формы по изменению электрофоретической подвижности комплекса Ku-антиген\*AP-ДНК в присутствии антител, специфичных к С- или N-концу Ku80. После предварительной инкубации при 37°C в течение 10 мин 5'-[<sup>32</sup>P] AP-ДНК (20 нМ) с белками экстрактов (0.1 мг/мл) к части реакционных смесей были добавлены определенные анти-Ku80 антитела (дор. 3, 5, 7 (б) или дор. 2, 4, 6 (в)). Анализ проводили в 8% ПААГ в нативных условиях. Тип использованного экстракта и антител указан на рисунке.

В некоторых образцах обнаружен интенсивный продукт сшивки с меньшей кажущейся молекулярной массой (рис. 11а, дор. 6 и 7). Согласно литературным данным в некоторых культивируемых клетках человека представлена укороченная с С-конца форма Ku80 (Ku80v), возникающая под действием трипсиноподобной протеазы, существующей в этих клетках и активирующейся в определенных условиях [Sallmyr *et al.*, 2002, Jeng *et al.*, 1999]. Соответствующая Ku80v мРНК не обнаружена [Han *et al.*, 1996, Muller *et al.*, 1998]. Ku80v образует гетеродимеры с Ku70, сохраняющие активность в связывании ДНК, но не взаимодействующие с ДНК-ПКкс, что уменьшает негомологичное соединение концов и приводит к увеличению радиочувствительности клеток [Han *et al.*, 1996, Muller *et al.*, 1998].

Образцы 5-7 (выделено малиновым прямоугольником) относятся к одной клеточной линии Mel 051102k, но отличаются по условиям приготовления экстрактов. Экстракт в образце 7 готовили по стандартной методике, а в случае образцов 5 и 6 предпринимали специальные меры для уменьшения вероятности протеолиза Ku80. Дальнейший анализ с использованием антител, специфичных к С- и N-концам Ku80 (рис. 11б), позволил отнести указанные продукты к укороченному с С-конца полипептиду Ku80. Для этой клеточной линии, по-видимому, также характерна экспрессия такой специфической протеазы. Таким образом, с использованием AP-ДНК в экстрактах клеток возможна детекция активных в связывании ДНК форм Ku-антигена, в том числе укороченных. В таких сложных случаях адекватность оценки количества белка с использованием антител будет зависеть от правильности их выбора, а часто применяемая оценка, основанная на определении количества мРНК, может давать искаженные данные.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе впервые проведена количественная оценка эффективности синтеза фотоактивируемых ДНК ферментами клеточных экстрактов (в том числе клеток человека) с использованием нескольких аналогов dNTP в качестве субстрата и модификации белков экстрактов полученными *in situ* фотоактивируемыми ДНК. Как следует из данных анализа, наиболее перспективным для исследований в клеточных экстрактах является вновь синтезированный FAP-dCTP, который обеспечивает максимальные выходы продуктов модификации клеточных белков из всех синтезированных и исследованных до сих пор аналогов dNTP.

При скрининге экстрактов клеток человека с использованием AP-ДНК обнаружена эффективная и селективная модификация одного белка, которая опосредована образованием основания Шиффа. Идентификация белка была осуществлена за счет сочетания аффинной модификации белков AP-сайт-содержащими и фотоактивируемыми ДНК с другими подходами. Для

идентификации белка была отработана специальная методика, позволяющая установить природу белка на основе данных масс-спектрометрического анализа пептидов, полученных при гидролизе белка в составе конъюгата с AP-ДНК, образовавшегося в экстракте. Белок идентифицирован как Ku80-субъединица Ku-антигена. Предложенная схема затем была с успехом применена для идентификации еще одного белка взаимодействующего с AP-сайтами – поли (ADP-рибозо)полимеразы 1 [Ходырева с соавт., 2010, Khodyreva et al., 2010]. Этот подход довольно универсален и может применяться для идентификации различных ДНК-связывающих белков с использованием ДНК, содержащих структурные элементы, специфически узнаваемыми белками.

Впервые обнаруженное взаимодействие Ku80 с AP-сайтами ставит вопрос о биологической значимости таких взаимодействий. Возможно, что ковалентное, но обратимое присоединение белков к AP-ДНК через основание Шиффа, служит для временной защиты AP-сайтов. Временная защита AP-сайтов особенно важна, когда они входят в состав кластерных повреждений, например, близко расположенных в комплементарной цепи разрывов или AP-сайтов, поскольку в результате «попытки» репарации могут образовываться двухцепочечные разрывы, которые более токсичны для клеток [Gulston et al., 2004]. Действительно, в настоящей работе обнаружено, что Ku80 ингибирует гидролиз AP-сайтов APE1. В пользу защитных функций свидетельствует стабильность комплексов Ku-антигена с AP-ДНК. При исследовании взаимодействия ДНК-зависимой протеинкиназы как источника Ku-антигена с ДНК, содержащей AP-сайт на расстоянии 15 нуклеотидных звеньев от концов, расщепления AP-сайтов не обнаружено. Не исключено, что проявление AP-лиазной активности белками зависит от структурных особенностей ДНК. В недавно опубликованной работе [Roberts et al., 2010] показано, что Ku-антиген проявляет слабую AP-лиазную активность, когда AP-сайт расположен непосредственно вблизи двухцепочечных концов. Однако если AP-сайт расположен на расстоянии более одного витка спирали от конца, как и в случае использованных в настоящей работе AP-ДНК, из-за образования непродуктивного комплекса AP-лиазная активность Ku-антигена не проявлялась. В настоящей работе предложен подход для оценки содержания Ku-антигена в клеточном экстракте, основанный на использовании AP-ДНК. Этот способ обладает некоторыми преимуществами по сравнению с применяемыми на данный момент методами оценки содержания Ku-антигена. В отличие от других методов он позволяет оценивать содержание в клеточных экстрактах форм Ku-антигена (в том числе с укороченной Ku80-субъединицей), которые активны в связывании ДНК.

## ВЫВОДЫ

1. Охарактеризован вновь синтезированный аналог dСТР – экзо-N-{2-[N-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил]-аминоэтил}-2'-дезоксирибоцитидин-5'-трифосфат (FAP-dСТР) в системах, содержащих ДНК-полимеразу  $\beta$  или экстракт клеток HeLa. При сравнительном анализе нового и двух ранее использованных аналогов dСТР – экзо-N-[(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензилиденаминоокси)-бутило-кси]-2'-дезоксирибоцитидин-5'-трифосфата и экзо-N-[2-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензилиденаминооксиметилкарбамоил)-этил]-2'-дезоксирибоцитидин-5'-трифосфата – установлено, что FAP-dСТР по эффективности включения в ДНК ДНК-полимеразами не уступает, а по уровню сшивки FAP-dСМР-содержащих ДНК с белками, значительно превосходит ранее использованные арализидные производные dСТР.
2. В экстрактах клеток человека проведен поиск белков, взаимодействующих с апуриновыми/апиримидиновыми (АР-) сайтами с образованием основания Шиффа; методами иммуноферментного и масс-спектрометрического анализа основной белок-мишень АР-ДНК идентифицирован как Ku80-субъединица Ku-антигена.
3. Установлено, что Ku-антиген в экстрактах специфически узнает АР-ДНК и образует с ней долгоживущие ковалентные аддукты; Ku-антиген в составе ДНК-зависимой протеинкиназы не расщепляет ДНК по положению АР-сайта и ингибирует АР-эндонуклеазную активность АР-эндонуклеазы 1 человека.
4. Сравнительный анализ модификации Ku-антигена в экстрактах клеток человека ДНК, содержащими АР-сайт или FAP-dСМР в середине одной цепи и дополнительные повреждения в противоположной цепи ДНК, показал, что соотношение уровней модификации Ku70 и Ku80-субъединиц фотоактивируемыми ДНК и уровень модификации Ku80-субъединицы АР-ДНК зависят от типа дополнительного повреждения; для АР-ДНК эффективность сшивки, по-видимому, определяется взаимным положением реагирующих групп белка и ДНК.
5. Показано, что АР-ДНК можно применять для оценки относительного содержания Ku-антигена в экстрактах клеток человека и регистрации активных в связывании ДНК форм этого белка.

**Основные результаты диссертации опубликованы в работах:**

1. Dezhurov S.V., Khodyreva S.N., **Plekhanova E.S.**, Lavrik O.I. *A new highly efficient photoreactive analogue of dCTP. Synthesis, characterization, and application in photoaffinity modification of DNA binding proteins* // Bioconjug. Chem. –2005. –V. 16. –P. 215–222.
2. **Плеханова Е.С.**, Солодова Е.И., Пышный Д.В., Пышная И.А., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. *Взаимодействие белков клеточных экстрактов с химически активными ДНК* // Труды международной конференции «Физико-химическая биология». Новосибирск: АРТА. 2006. С. 157–158.
3. **Пина Е.С.**, Lavrik O.I., Khodyreva S.N. *Ku antigen interacts with abasic sites* // Biochim. Biophys. Acta –2008. –V. 1784. –P. 1777–1785.
4. **Ильина Е.С.**, Лаврик О.И., Ходырева С.Н. *Идентификация Ku80-субъединицы Ku-антигена как белка, взаимодействующего с апуриновыми/апиримидиновыми сайтами* // Докл. Акад. Наук –2009. –Т. 424. –С. 411–414.
5. **Пина Е.С.**, Khodyreva S.N., Berezhnoy A.E., Larin S.S., Lavrik O.I. *Tracking Ku antigen levels in cell extracts with DNA containing abasic sites* // Mutat. Res. –2010. –V. 685. –P. 90–96.
6. **Ильина Е.С.**, Лаврик О.И., Ходырева С.Н. *Способ детекции Ku-антигена в экстрактах клеток человека* // Патент на изобретение RU № 2384623, приоритет от 07.10.2008.